

BH

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-120025

(43)Date of publication of application : 21.04.1992

(51)Int.Cl.

A61K 39/395

A61K 37/02

(21)Application number : 02-235872

(71)Applicant : TOSOH CORP

CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

KISHIMOTO CHUZO

(22)Date of filing : 07.09.1990

(72)Inventor : MIHARA MASAHIKO

KOISHIHARA YASUO

FUKUI HIROYASU

(54) ENHANCER OF INTERLEUKIN-6 ACTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an agent of developing or enhancing action of interleukin-6 (IL-6), comprising an anti-interleukin-6 antibody as an active ingredient.

CONSTITUTION: An agent of developing or enhancing action of interleukin-6 (IL-6), comprising an anti-IL-6 antibody, having preferably IL-6 activity, such as suppressing intake of 3H-thymidine of hybridoma MH60 depending upon IL-6 and growing and having incomplete inhibitory action on bond between IL-6 receptor and IL-6 or not having at all, as an active ingredient. Any of a monoclonal antibody and a polyclonal antibody is used as the anti-IL-6 antibody and a monoclonal antibody derived from hybridoma MH 166strain (FERM P-9645) is preferably used. The enhancer is administered simultaneously with IL-6 or at an interval after administration of IL-6, enhances action of IL-6- containing immunoactivator, etc., and improves treating effects.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-120025

⑬ Int. Cl.⁵

A 61 K 39/395
37/02

識別記号

ABD U

庁内整理番号

8829-4C
8317-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)4月21日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全6頁)

⑮ 発明の名称 インターロイキン-6の作用増強剤

⑯ 特 願 平2-235872

⑰ 出 願 平2(1990)9月7日

⑱ 発 明 者	三 原 昌 彦	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑱ 発 明 者	小 石 原 保 夫	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑱ 発 明 者	福 井 博 泰	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑲ 出 願 人	東 ソ ー 株 式 会 社	山口県新南陽市開成町4560番地	
⑲ 出 願 人	中外製薬株式会社	東京都北区浮間5丁目5番1号	
⑲ 出 願 人	岸 本 忠 三	大阪府富田林市中野町3丁目5番31号	
⑳ 代 理 人	弁理士 青 木 朗	外 4 名	

明 細 書

1. 発明の名称

インターロイキン-6の作用増強剤

2. 特許請求の範囲

1. 抗インターロイキン-6抗体を有効成分とするインターロイキン-6の作用の発現又は増強剤。

2. 抗インターロイキン-6抗体がモノクローナル抗体である、請求項1に記載の作用の発現又は増強剤。

3. 抗インターロイキン-6抗体がインターロイキン-6とインターロイキン-6レセプターとの結合に対して不完全な抑制作用を示すか又は当該抑制作用を示さない抗体である請求項1に記載の作用の発現又は増強剤。

4. 抗インターロイキン-6抗体がMH 166由来のモノクローナル抗体である、請求項2に記載の作用の発現又は増強剤。

5. 抗インターロイキン-6抗体がキメラ抗体である、請求項1に記載の作用の発現又は増強剤。

6. インターロイキン-6及び抗-インターロイキン-6抗体を有効成分として含有する免疫賦活剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はインターロイキン-6（以下「IL-6」と略す）の作用増強剤に関するものである。

〔従来の技術〕

IL-6は、活性化B細胞に対して、増殖を促すことなく抗体産生細胞への分化を誘導する極性因子として見出された(Muraguchi, A.ら、J. Exp. Med. 167, 332, 1988)。このIL-6は、184個のアミノ酸残基から構成されているポリペプチドであることが明らかにされている(Hirano, T.ら、Nature 324, 73, 1986)。

そして、このIL-6は、様々な細胞から産生され、多彩な生理活性を有していることが報告されている。その代表的例として外来抗原に対する免疫反応を増強すること(Takatsuki, F.ら、J. Immunol.,

141, 3072, 1988) が報告されており、様々な疾患の治療の可能性が知られている。

一方、このIL-6に対して特異性を示す抗-IL-6抗体についての報告もなされており(例えば、特開平2-488号公報、Biochemical and Biophysical Research Communication, 165, 728-734, 1989等)、検査用試薬、分離精製用として、またはいくつかの疾病治療への利用が期待されている。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、これ迄に報告されている研究成果はいずれも試験管内(in vitro)での研究にとどまっており、IL-6の様々な作用に関し、抗-IL-6抗体の生体内(in vivo)における影響についての報告は少ない。本発明者は、IL-6の作用に対し、抗-IL-6抗体の注射が及ぼす影響を検討した結果、ある種の抗-IL-6抗体がIL-6の作用を増強させることを見出し、本発明を完成するに至った。

われる。

本発明における抗-IL-6抗体は、IL-6を特異的に認識するものであり、これにはポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が含まれる。即ち、本発明の抗-IL-6抗体としては、例えば同種動物間又は異種動物間で免疫して得られたポリクローナル抗体、さらにはハイブリドーマ技術に従って得られたモノクローナル抗体を用いることができる。ヒトに対して臨床的に用いる場合は、抗原性、抗体の免疫活性からみてヒト由来の抗体が好ましいが、ヒト以外の動物由来の抗体のFc部分をヒト抗体のFcにより置き換えたり、CDR(相補性決定領域)以外の部分を全てヒト由来の抗体に置き換えることによりヒトへの抗原性を少なくしたいいわゆるキメラ抗体や、遺伝子組換え技術により生産されるヒト型化抗体を用いることも可能である。

ポリクローナル抗体の作製は、常法に従って、例えばIL-6によりマウス、ウサギ、ヒツジ又はヤギ等を免疫感作することによって行うことがで

従って、本発明はIL-6の作用の増強剤を提供しようとするものである。

(発明の具体的説明)

すなわち本発明は、抗-IL-6抗体を有効成分として含有するIL-6の作用増強剤に関するものであり、IL-6を生体に投与する際、ある種の抗-IL-6抗体を投与することによってIL-6の生理活性を発現し、又は更に増強することができるとの知見に基づくものである。ある種の抗-IL-6抗体は、in vitro試験において、IL-6活性、例えばIL-6に依存して生育するハイブリドーマMH60の³H-チミジンの取り込みを抑制するが、IL-6レセプターとIL-6の結合に対する抑制作用は不完全であり、またあるものは当該抑制作用を示さない。このような特性を有する抗-IL-6抗体が、本発明に好適に用いられるものと考えられる。その作用増強機構は必ずしも明らかではないが、抗-IL-6抗体が、生体におけるIL-6の血中半減期を延長させることに起因しているとも思

きる。免疫原のIL-6としては、大腸菌等で生産した遺伝子組換えによるもの、あるいはヒト扁桃腺単核球、ヒト末梢血単核球、またはヒトTリンホーマ等のヒト腫瘍細胞またはハイブリドーマ由来のものを用いることが可能である。

ハイブリドーマの作製も常法に従って行うことができる。例えば、前記の免疫原により、マウス等の哺乳類を免疫し、この動物から脾臓細胞を得て、これを樹立されたミエローマ細胞と融合させる。次いで目的とする反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングすることができる。

モノクローナル抗体を製造するには、前記のようにしてクローニングされたハイブリドーマを培養し、培養上清からモノクローナル抗体を採取する。あるいは、前記ハイブリドーマを動物の腹腔内に接種し、腹水を得て、これからモノクローナル抗体を単離することもできる。ハイブリドーマ細胞上清中の抗体又は腹水中の抗体は、常法に従って、例えば硫酸アンモニウム塩析により濃縮す

ることができ、さらにアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

上記のポリクローナル抗体の製造方法、ハイブリドーマの作製方法、モノクローナル抗体の調製方法、抗体の回収、精製方法は、いずれもそれ自体当業者によりよく知られている方法により行うことができる。

特開平2-488号明細書には、抗-IL-6抗体を産生するハイブリドーマとして、ヒトIL-6で免疫したマウスリンパ節細胞と、マウス骨髓腫細胞との間のハイブリドーマである、ハイブリドーマMH 166株等が記載されている。本発明において用いることのできる抗-IL-6抗体の好ましい具体例としては、ハイブリドーマMH 166株(PBRM P-9656)に由来する抗-IL-6抗体(以下MH 166抗体と呼ぶ)が挙げられる。

本発明の増強剤の投与は、IL-6と同時に若しくはIL-6の投与とは間隔をおいて行うことができる。また本発明の増強剤とIL-6とを混合物として投与することもできる。

[実施例]

実施例1. MH 166抗体の調製

MH 166抗体は、特開平2-488号公報の記載に基づき大量調製したものを使用した。即ち、MH 166細胞を、プリスタン(2, 6, 10, 14-テトラメタルデカン酸)で処理したBALB/cマウスの腹腔内に投与し、増殖させ、腹水中に産生されたIgG分画を硫酸沈殿させた後DBABセルロースを用いて精製した。これをPBSで適当に希釈して以下の実施例に用いた。

実施例2. 抗-DNP抗体産生増強作用

C3H/HeJ系雌性マウスに、抗原としてDNP-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)を投与し、更にMH 166抗体及びIL-6を投与した。即ち、10 μ gのDNP-KLH溶液を静脈注射し、24時間後、実施例1で得たMH 166抗体溶液0.5 μ lを腹腔内に投与した。この抗体の投与量(μ g/マウス)を第1表に示す。遺伝子工学的手法により大腸菌で生産したA1a-ヒト-IL-6(特開昭63-157998号公報参照)をPBSを含む10%マウス血清に溶解し

IL-6の生理活性については種々の報告がなされているが、本発明は、IL-6の生理活性を利用した治療薬、例えば免疫賦活剤等の作用を更に増強させ、治療効果を向上させることが可能となる。

本発明の増強剤は、皮下注射又は静脈注射により投与することが好ましい。

投与量は、被検体に投与されるIL-6の量、使用する抗体の種類、IL-6の活性阻害の程度若しくはクラス等及び対象となる疾患によって適宜定められるが、MH 166抗体の場合、成人一人当たり0.1~100mg/日である。

本発明の増強剤は、抗-IL-6抗体を常用の注射用キャリアー、例えば生理食塩溶液、と混合した後、滅菌濾過し、所望により凍結乾燥することにより製造できる。

本発明の免疫賦活剤についても、投与方法、投与量及び製剤化は、前記の増強剤とはほぼ同様に行うことが出来る。

て、抗体投与の1時間後及び24時間後に、第1表に記載の投与量を皮下に投与した。抗原投与後7日目に血清を採取し、抗-DNP抗体量を以下に記載のELISA法に従って測定した。なお、参照として、IL-6の代りにヒト血清アルブミン(HSA)を投与した場合についても同様の実験を行った。

まず、100 μ lのDNP-BSA(50 μ g/ μ l)溶液をELISA用のプレートに加えて4℃で24時間反応させ固定した。洗浄後、1%BSA-PBS溶液を150 μ l加えて、室温で2時間放置した。洗浄後、適度に希釈した被験血清を100 μ l加えて室温で1時間反応させたのち、再びプレートを洗い、アルカリホスファターゼ標識した抗マウスIgG抗体または抗マウスIgM抗体を100 μ l加えて1時間反応させた。その後プレートを洗浄し、基質溶液(Sigma 104, 1mg/ μ l)を加え、各ウエルの吸光度を405~600nmで測定した。その吸光度を、DNPで免疫してHSAを投与したマウスの血清のそれを100ユニット/ μ lとして、ユニット換算を行った。

また、それらのマウスの脾臓を摘出し、その重

量を測定した。

それらの結果は第1表に示される通りである。

第1表
抗-DNP抗体の産生に対する抗-IL-6抗体の作用

処 理 (例)	MH 166 (mg)	N (動物数)	脾臓重量 (mg)	抗体産生量 (ユニット/ml)		
				I g G	I g M	
〔実験Ⅰ〕						
HSA	10	--	5	117±3.1	79.3±16.98	98.9±18.68
HSA	10	5.0	5	117±2.7	79.2±13.66	110.3±30.91
IL-6	2	--	5	122±4.2	98.4±26.22	88.0± 8.38
IL-6	2	5.0	6	152±3.4 ← *****	162.2±28.75 ← *	119.1±15.37
IL-6	10	--	5	126±3.8	138.7±32.29	121.9±48.39
IL-6	10	5.0	6	194±7.1 ← *****	352.5±65.46 ← **	207.0±50.69
〔実験Ⅱ〕						
HSA	10	--	6	116± 3.4	70.7± 14.11	74.0± 6.02
IL-6	10	--	5	114± 8.5	148.2± 24.42 ← ***	104.7±12.49 ← **
IL-6	10	0.2	5	171± 8.9 ← ****	415.1±155.48	183.6±32.09 ← *
IL-6	10	1.0	5	186±11.1 ← *****	412.9± 48.35 ← ****	176.7±18.48 ← ***

表中、Student's t 検定における差の有意性を * : $P < 0.1$; ** : $P < 0.05$;
*** : $P < 0.02$; **** : $P < 0.01$; ***** : $P < 0.001$ で示す。

第1表は、IL-6とMH 166抗体の併用投与により、抗-DNP抗体産生の増強および脾臓重量の増加に対するIL-6の効果が発現し又はIL-6の効果が上昇することを示している。

実施例3. 抗-SRBC抗体産生増強作用

免疫原として、DNPにかえてSRBC（ヒツジ赤血球） 10^8 個を用い、実施例2と同様の方法に従ってMH 166抗体及びIL-6を投与した。抗-SRBC抗体量を以下に記載のELISA法に従って測定した。

まず、100 μ lのDNP-SRBC（50 μ g/ μ l）溶液をELISA用のプレートに加えて37℃で2時間反応させた後、1%のglutaraldehyde溶液を100 μ l加えて、室温で30分間放置して、SRBCをプレートに固定した。PBSで3回洗浄し、1%BSA-PBS溶液を100 μ l加えて、4℃で24時間反応させて非特異的結合物をブロックした。洗浄後、適度に希釈した被験血清を100 μ l加えて室温で1時間反応させたのち、再びプレートを洗い、アルカリホスファターゼ標識した抗マウスIgG抗体または抗マウスIgM抗体を100 μ l加えて1時間反応させた。

その後プレートを洗浄し、基質溶液（Sigma 104、1mg/ μ l）を加え、各ウェルの吸光度を405-600nmで測定した。その吸光度を、SRBCで免疫してHSAを投与したマウスの血清のそれを100ユニット/ μ lとして、ユニット換算を行った。

また、それらのマウスの脾臓を摘出し、その重量を測定した。

それらの結果は第2表に示される通りである。

第2表
抗-SRBC抗体の産生に対するMH 166抗体の効果

処 理 (μl)	MH 166 (μg)	N (動物数)	脾臓重量 (μg)	抗体産生量 (ユニット/μl)		
				I g G	I g M	
HSA	10	--	6	129±6.3	115.8± 8.91	113.9± 7.99
HSA	10	5.0	5	118±9.0	113.5±11.15	116.7±14.77
1L-6	10	--	5	116±6.3	141.8±19.91	146.6±23.28
1L-6	10	5.0	5	198±7.1 ← *****	435.4±57.31 ← *****	195.9± 3.74 ← .

*: $P < 0.1$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$ で示す。

第2表は、IL-6と抗-IL-6抗体の併用投与により抗-SRBC抗体産生の増強および脾臓重量の増加に対するIL-6の効果が発現し又は上昇することを示している。

実施例4.

BALB/C系マウスに、IL-6及びMH 166抗体を投与し、IL-6のみを投与したマウス群とその血中のIL-6の濃度変化を比較した。IL-6の血中濃度の測定はドットブロッキング法により行った。すなわち、IL-6及びMH 166抗体を投与した後、1日間目、6時間目及び24時間目に血液サンプルを採取し、これをTBSで300倍、900倍及び2700倍に希釈し、これらの希釈したサンプルをニトロセルロースに固定し、家兎抗-ヒトIL-6ポリクローナル抗体により検出した。この結果を第1図に示す。

第1図は、MH 166抗体の併用により、投与されたIL-6の血中濃度が持続することを示している。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、血中のIL-6濃度の、ドットブロッ

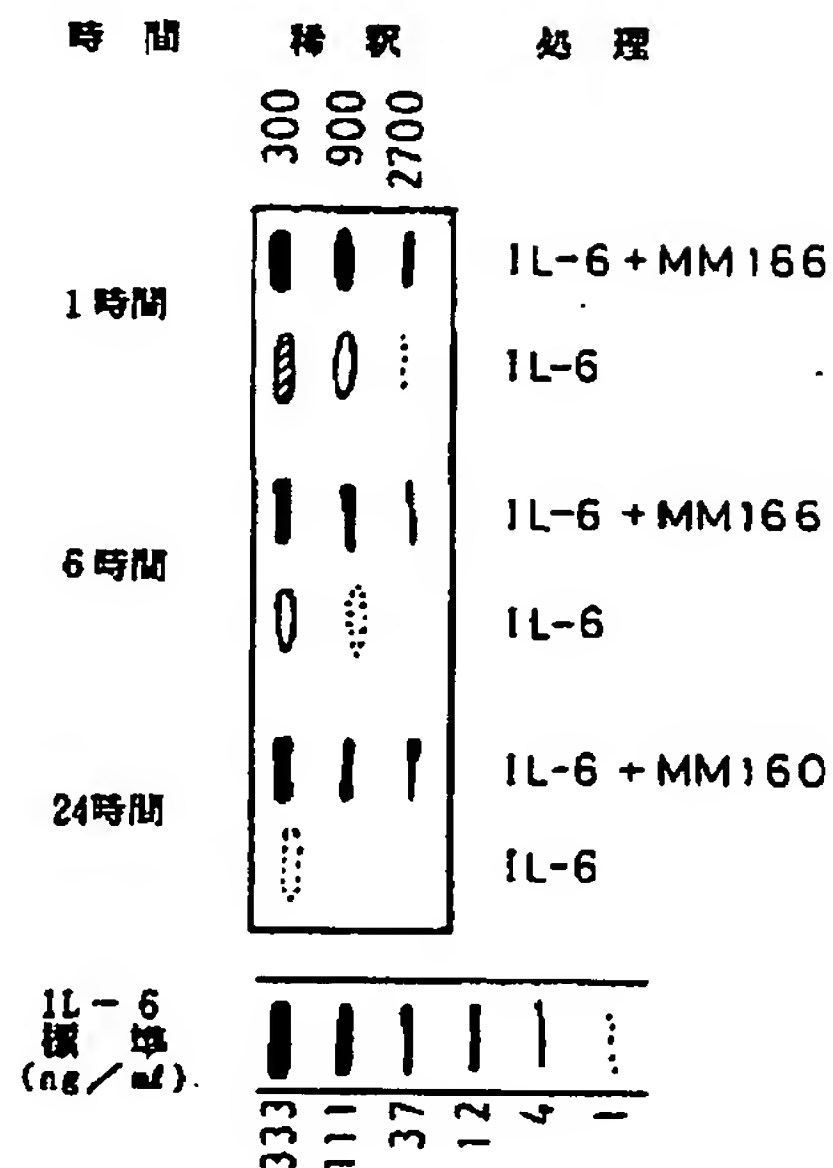
ティング法による測定結果を示した図である。

特許出願人

東ソー株式会社
中外製薬株式会社
岸 本 忠 三

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗
弁理士 石 田 敬
弁理士 福 本 積
弁理士 山 口 昭 之
弁理士 西 山 雅 也



第 1 図

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第3部門第2区分
【発行日】平成11年(1999)4月20日

【公開番号】特開平4-120025
【公開日】平成4年(1992)4月21日
【年通号数】公開特許公報4-1201
【出願番号】特願平2-235872
【国際特許分類第6版】

A61K 39/395 AGA
38/00
39/395 ABD

【F I】

A61K 39/395 AGA D
ABD U
37/02

手 続 補 正 書

平成8年6月8日

特許庁長官 坂 井 隆 光 閣

1. 事件の箇所
平成3年特許第135872号
2. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
名称 (389) 星ソー株式会社
名称 (121) 中外製薬株式会社
氏名 岸 本 忠 三

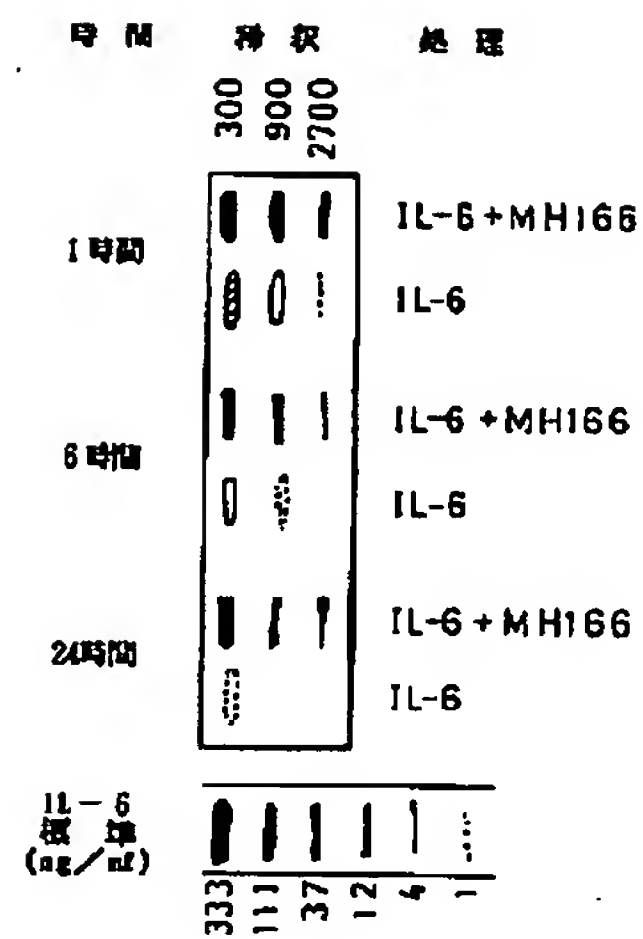
3. 代理人
住所 〒105 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37ビル
青和特許法律事務所 電話 03 5470-1800
氏名 弁護士(〒51) 石 田 敬

4. 補正対象書類名
明 細 書
5. 補正対象項目名
特許請求の範囲、発明の詳述な説明及び図面
6. 補正の内容
□ 特許請求の範囲を明細書の通りに補正する。
□(2) 以下の箇所「抗-IL-6抗体」を「抗IL-6抗体」に補正する。
明細書第3頁第3-4行、第13-14行、第16行、第17行、第4頁第4行、第5

～7行、第9～10行、第15～16行、第18行、第5頁第2行、第5行、第7頁第8
行、第14行、第15行、第9頁第13行、第12頁第1次の表欄、第16頁第1行。
(4) 同第7頁第11行の「ヘブリドーマ」を「ハイブリドーマ」に補正する。
(5) 同第9頁第11行、第10頁第3行、第12頁第1表の表欄、第12頁第2行の
「抗-IL6抗体」を「抗IL6抗体」に補正する。
(6) 同第13頁第5行、第15頁第2表の表欄、第16頁第3行の「抗-IL6抗体」
を「抗IL6抗体」に補正する。
(7) 同第16頁第10行の「IL-6」を「IL-8」に補正する。
(8) 同第16頁第11行の「1日間」を「1週間」に補正する。
(9) 同第16頁第14～15行の「抗-ヒトIL-8モノクローナル抗体」を「抗
ヒトIL-8モノクローナル抗体」に補正する。
(10) 図1図を明細書の通りに補正する。
7. 添付書類の目録
(1) 特許請求の範囲 1通
(2) 図面(第1図) 1通

1. 特許請求の範囲

1. 抗インターロイキン-6抗体を有効成分とするインターロイキン-6の作用の阻害又は増強剤。
2. 抗インターロイキン-6抗体がモノクローナル抗体である。請求項1に記載の作用の阻害又は増強剤。
3. 抗インターロイキン-6抗体がインターロイキン-6とインターロイキン-6レセプターとの結合に対して不完全な抑制作用を示すか又は阻害作用を示さない抗体である請求項1に記載の作用の阻害又は増強剤。
4. 抗インターロイキン-6抗体がヒト由来のモノクローナル抗体である。請求項1に記載の作用の阻害又は増強剤。
5. 抗インターロイキン-6抗体がキヌタ抗体である。請求項1に記載の作用の阻害又は増強剤。
6. インターロイキン-6及び抗インターロイキン-6抗体を有効成分として含有する免疫賦活剤。



第1図

⑫ 公開特許公報(A) 平4-120025

⑤Int.Cl.⁵A 61 K 39/395
37/02

識別記号

ABD U

庁内整理番号

8829-4C
8317-4C

⑬公開 平成4年(1992)4月21日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全6頁)

⑭発明の名称 インターロイキン-6の作用増強剤

⑮特 願 平2-235872

⑯出 願 平2(1990)9月7日

⑰発明者	三 原 昌 彦	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑰発明者	小 石 原 保 夫	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑰発明者	福 井 博 泰	静岡県御殿場市駒門1丁目135番地	中外製薬株式会社内
⑰出願人	東 ソ ー 株 式 会 社	山口県新南陽市開成町4560番地	
⑰出願人	中外製薬株式会社	東京都北区浮間5丁目5番1号	
⑰出願人	岸 本 忠 三	大阪府富田林市中野町3丁目5番31号	
⑰代理人	弁理士 青 木 朗	外 4 名	

明 細 書

1. 発明の名称

インターロイキン-6の作用増強剤

2. 特許請求の範囲

1. 抗インターロイキン-6抗体を有効成分とするインターロイキン-6の作用の発現又は増強剤。

2. 抗インターロイキン-6抗体がモノクローナル抗体である、請求項1に記載の作用の発現又は増強剤。

3. 抗インターロイキン-6抗体がインターロイキン-6とインターロイキン-6レセプターとの結合に対して不完全な抑制作用を示すか又は当該抑制作用を示さない抗体である請求項1に記載の作用の発現又は増強剤。

4. 抗インターロイキン-6抗体がMH 166由来のモノクローナル抗体である、請求項2に記載の作用の発現又は増強剤。

5. 抗インターロイキン-6抗体がキメラ抗体である、請求項1に記載の作用の発現又は増強剤。

6. インターロイキン-6及び抗-インターロイキン-6抗体を有効成分として含有する免疫賦活剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はインターロイキン-6（以下「IL-6」と略す）の作用増強剤に関するものである。

〔従来の技術〕

IL-6は、活性化B細胞に対して、増殖を促すことなく抗体産生細胞への分化を誘導する液性因子として見出された(Muraguchi, A.ら、J. Exp. Med. 167, 332, 1988)。このIL-6は、184個のアミノ酸残基から構成されているポリペプチドであることが明らかにされている(Hirano, T.ら、Nature 324, 73, 1986)。

そして、このIL-6は、様々な細胞から産生され、多彩な生理活性を有していることが報告されている。その代表的例として外来抗原に対する免疫反応を増強すること(Takatsuki, P.ら、T. Immunol.,

141, 3072, 1988) が報告されており、様々な疾患の治療の可能性が知られている。

一方、このIL-6に対して特異性を示す抗-IL-6抗体についての報告もなされており(例えば、特開平2-488号公報、Biochemical and Biophysical Research Communication, 165, 728-734, 1989等)、検査用試薬、分離精製用として、またはいくつかの疾病治療への利用が期待されている。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、これ迄に報告されている研究成果はいずれも試験管内(in vitro)での研究にとどまっており、IL-6の様々な作用に関し、抗-IL-6抗体の生体内(in vivo)における影響についての報告は少ない。本発明者は、IL-6の作用に対し、抗-IL-6抗体の注射が及ぼす影響を検討した結果、ある種の抗-IL-6抗体がIL-6の作用を増強させることを見出し、本発明を完成するに至った。

われる。

本発明における抗-IL-6抗体は、IL-6を特異的に認識するものであり、これにはポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が含まれる。即ち、本発明の抗-IL-6抗体としては、例えば同種動物間又は異種動物間で免疫して得られたポリクローナル抗体、さらにはハイブリドーマ技術に従って得られたモノクローナル抗体を用いることができる。ヒトに対して臨床的に用いる場合は、抗原性、抗体の免疫活性からみてヒト由来の抗体が好ましいが、ヒト以外の動物由来の抗体のFc部分をヒト抗体のFcにより置き換えたり、CDR(相補性決定領域)以外の部分を全てヒト由来の抗体に置き換えることによりヒトへの抗原性を少なくしたいいわゆるキメラ抗体や、遺伝子組換え技術により生産されるヒト型化抗体を用いることも可能である。

ポリクローナル抗体の作製は、常法に従って、例えばIL-6によりマウス、ウサギ、ヒツジ又はヤギ等を免疫感作することによって行うことがで

従って、本発明はIL-6の作用の増強剤を提供しようとするものである。

(発明の具体的説明)

すなわち本発明は、抗-IL-6抗体を有効成分として含有するIL-6の作用増強剤に関するものであり、IL-6を生体に投与する際、ある種の抗-IL-6抗体を投与することによってIL-6の生理活性を発現し、又は更に増強することができるとの知見に基づくものである。ある種の抗-IL-6抗体は、in vitro試験において、IL-6活性、例えばIL-6に依存して生育するハイブリドーマMH60の³H-チミジンの取り込みを抑制するが、IL-6レセプターとIL-6の結合に対する抑制作用は不完全であり、またあるものは当該抑制作用を示さない。このような特性を有する抗-IL-6抗体が、本発明に好適に用いられるものと考えられる。その作用増強機構は必ずしも明らかではないが、抗-IL-6抗体が、生体におけるIL-6の血中半減期を延長させることに起因しているとも思

きる。免疫原のIL-6としては、大腸菌等で生産した遺伝子組換えによるもの、あるいはヒト扁桃腺単核球、ヒト末梢血単核球、またはヒトTリンホーマ等のヒト腫瘍細胞またはハイブリドーマ由来のものを用いることが可能である。

ハイブリドーマの作製も常法に従って行うことができる。例えば、前記の免疫原により、マウス等の哺乳類を免疫し、この動物から脾臓細胞を得て、これを樹立されたミエローマ細胞と融合させる。次いで目的とする反応性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングすることができる。

モノクローナル抗体を製造するには、前記のようにしてクローニングされたハイブリドーマを培養し、培養上清からモノクローナル抗体を採取する。あるいは、前記ハイブリドーマを動物の腹腔内に接種し、腹水を得て、これからモノクローナル抗体を単離することもできる。ハイブリドーマ細胞上清中の抗体又は腹水中の抗体は、常法に従って、例えば硫酸アンモニウム塩析により濃縮す

ることができ、さらにアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

上記のポリクローナル抗体の製造方法、ハイブリドーマの作製方法、モノクローナル抗体の調製方法、抗体の回収、精製方法は、いずれもそれ自体当業者によりよく知られている方法により行うことができる。

特開平2-488号明細書には、抗-IL-6抗体を産生するハイブリドーマとして、ヒトIL-6で免疫したマウスリンパ節細胞と、マウス骨髓腫細胞との間のハイブリドーマである、ハブリドーマMH 166株等が記載されている。本発明において用いることのできる抗-IL-6抗体の好ましい具体例としては、ハイブリドーマMH 166株(PERM P-9656)に由来する抗-IL-6抗体(以下MH 166抗体と呼ぶ)が挙げられる。

本発明の増強剤の投与は、IL-6と同時に若しくはIL-6の投与とは間隔をおいて行うことができる。また本発明の増強剤とIL-6とを混合物として投与することもできる。

(実施例)

実施例1. MH 166抗体の調製

MH 166抗体は、特開平2-488号公報の記載に基づき大量調製したものを使用した。即ち、MH 166細胞を、ブリストン(2, 6, 10, 14-テトラメタルデカン酸)で処理したBALB/cマウスの腹腔内に投与し、増殖させ、腹水中に産生されたIgG分画を硫酸沈殿させた後DEAEセルロースを用いて精製した。これをPBSで適当に希釈して以下の実施例に用いた。

実施例2. 抗-DNP抗体産生増強作用

C3H/HeJ系雌性マウスに、抗原としてDNP-KLH(Keyhole Limpet Hemocyanin)を投与し、更にMH 166抗体及びIL-6を投与した。即ち、10 μ gのDNP-KLH溶液を静脈注射し、24時間後、実施例1で得たMH 166抗体溶液0.5 μ lを腹腔内に投与した。この抗体の投与量(μ g/マウス)を第1表に示す。遺伝子工学的手法により大腸菌で生産したA1a-ヒト-IL-6(特開昭63-157996号公報参照)をPBSを含む10%マウス血清に溶解し

IL-6の生理活性については種々の報告がなされているが、本発明は、IL-6の生理活性を利用した治療薬、例えば免疫賦活剤等の作用を更に増強させ、治療効果を向上させることが可能となる。

本発明の増強剤は、皮下注射又は静脈注射により投与することが好ましい。

投与量は、被検体に投与されるIL-6の量、使用する抗体の種類、IL-6の活性阻害の程度若しくはクラス等及び対象となる疾患によって適宜定められるが、MH 166抗体の場合、成人一人当たり0.1~100mg/日である。

本発明の増強剤は、抗-IL-6抗体を常用の注射用キャリアー、例えば生理食塩溶液、と混合した後、濾過滅菌し、所望により凍結乾燥することにより製造できる。

本発明の免疫賦活剤についても、投与方法、投与量及び製剤化は、前記の増強剤とほぼ同様に行うことができる。

て、抗体投与の1時間後及び24時間後に、第1表に記載の投与量を皮下に投与した。抗原投与後7日目に血清を採取し、抗-DNP抗体量を以下に記載のELISA法に従って測定した。なお、参照として、IL-6の代りにヒト血清アルブミン(HSA)を投与した場合についても同様の実験を行った。

まず、100 μ lのDNP-BSA(50 μ g/ μ l)溶液をELISA用のプレートに加えて4℃で24時間反応させ固定した。洗浄後、1%BSA-PBS溶液を150 μ l加えて、室温で2時間放置した。洗浄後、適度に希釈した被験血清を100 μ l加えて室温で1時間反応させたのち、再びプレートを洗い、アルカリホスファターゼ標識した抗マウスIgG抗体または抗マウスIgM抗体を100 μ l加えて1時間反応させた。その後プレートを洗浄し、基質溶液(Sigma 104, 1 μ g/ μ l)を加え、各ウエルの吸光度を405-600nmで測定した。その吸光度を、DNPで免疫してHSAを投与したマウスの血清のそれを100ユニット/ μ lとして、ユニット換算を行った。

また、それらのマウスの脾臓を摘出し、その重

量を測定した。

それらの結果は第1表に示される通りである。

第1表
抗-DNP抗体の産生に対する抗-IL-6抗体の作用

処 理 (mg)	MH 166 (mg)	N (動物数)	脾臓重量 (mg)	抗体産生量 (ユニット/ml)		
				I g G	I g M	
〔実験Ⅰ〕						
HSA	10	--	5	117±3.1	79.3±16.98	98.9±18.68
HSA	10	5.0	5	117±2.7	79.2±13.66	110.3±30.91
1L-6	2	--	5	122±4.2	98.4±26.22	88.0± 8.38
1L-6	2	5.0	6	152±3.4	162.2±28.75	119.1±15.37
1L-6	10	--	5	126±3.8	138.7±32.29	121.9±48.39
1L-6	10	5.0	6	194±7.1	352.5±65.46	207.0±50.69
〔実験Ⅱ〕						
HSA	10	--	6	116± 3.4	70.7± 14.11	74.0± 6.02
1L-6	10	--	5	114± 8.5	148.2± 24.42	104.7±12.49
1L-6	10	0.2	5	171± 8.9	415.1±155.48	183.6±32.09
1L-6	10	1.0	5	186±11.1	412.9± 48.35	176.7±18.48

表中、Student's T 検定における差の有意性を * : $P < 0.1$; ** : $P < 0.05$;
*** : $P < 0.02$; **** : $P < 0.01$; ***** : $P < 0.001$ で示す。

第1表は、IL-6とMH 166抗体の併用投与により、抗-DNP抗体産生の増強および脾臓重量の増加に対するIL-6の効果が発現し又はIL-6の効果が上昇することを示している。

実施例3. 抗-SRBC抗体産生増強作用

免疫原として、DNPにかえてSRBC（ヒツジ赤血球） 10^8 個を用い、実施例2と同様の方法に従ってMH 166抗体及びIL-6を投与した。抗-SRBC抗体量を以下に記載のELISA法に従って測定した。

まず、 $100\mu\text{l}$ のDNP-SRBC ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 溶液をELISA用のプレートに加えて 37°C で2時間反応させた後、1%のglutaraldehyde溶液を $100\mu\text{l}$ 加えて、室温で30分間放置して、SRBCをプレートに固定した。PBSで3回洗浄し、1%BSA-PBS溶液を $100\mu\text{l}$ 加えて、 4°C で24時間反応させて非特異的結合物をブロックした。洗浄後、適度に希釈した被験血清を $100\mu\text{l}$ 加えて室温で1時間反応させたのち、再びプレートを洗い、アルカリホスファターゼ標識した抗マウスIgG抗体または抗マウスIgM抗体を $100\mu\text{l}$ 加えて1時間反応させた。

その後プレートを洗浄し、基質溶液 (Sigma 104, $1\text{mg}/\text{ml}$) を加え、各ウェルの吸光度を405-600nmで測定した。その吸光度を、SRBCで免疫してHSAを投与したマウスの血清のそれを100ユニット/ ml として、ユニット換算を行った。

また、それらのマウスの脾臓を摘出し、その重量を測定した。

それらの結果は第2表に示される通りである。

第2表
抗-SRBC抗体の産生に対するMH 166抗体の効果

処 理 (μg)	MH 166 (μg)	N (動物数)	脾臓重量 (mg)	抗体産生量 (ユニット/ml)		
				I g G	I g M	
HSA	10	--	6	129±6.3	115.8± 8.91	113.9± 7.99
HSA	10	5.0	5	118±9.0	113.5±11.15	116.7±14.77
1L-6	10	--	5	116±6.3	141.8±19.91	146.6±23.28
1L-6	10	5.0	5	198±7.1 ← *****	435.4±57.31 ← ****	195.9± 3.74 ← *

* : $P < 0.1$; **** : $P < 0.01$; ***** : $P < 0.001$ で示す。

第2表は、IL-6と抗-IL-6抗体の併用投与により抗-SRBC抗体産生の増強および脾臓重量の増加に対するIL-6の効果が発現し又は上昇することを示している。

実施例4.

BALB/C系マウスに、IL-6及びMH 166抗体を投与し、IL-6のみを投与したマウス群とその血中のIL-6の濃度変化を比較した。IL-6の血中濃度の測定はドットブロッキング法により行った。すなわち、IL-6及びMH 166抗体を投与した後、1日間目、6時間目及び24時間目に血液サンプルを採取し、これをTBSで300倍、900倍及び2700倍に希釈し、これらの希釈したサンプルをニトロセルロースに固定し、家兎抗-ヒトIL-6ポリクローナル抗体により検出した。この結果を第1図に示す。

第1図は、MH 166抗体の併用により、投与されたIL-6の血中濃度が持続することを示している。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、血中のIL-6濃度の、ドットブロッ

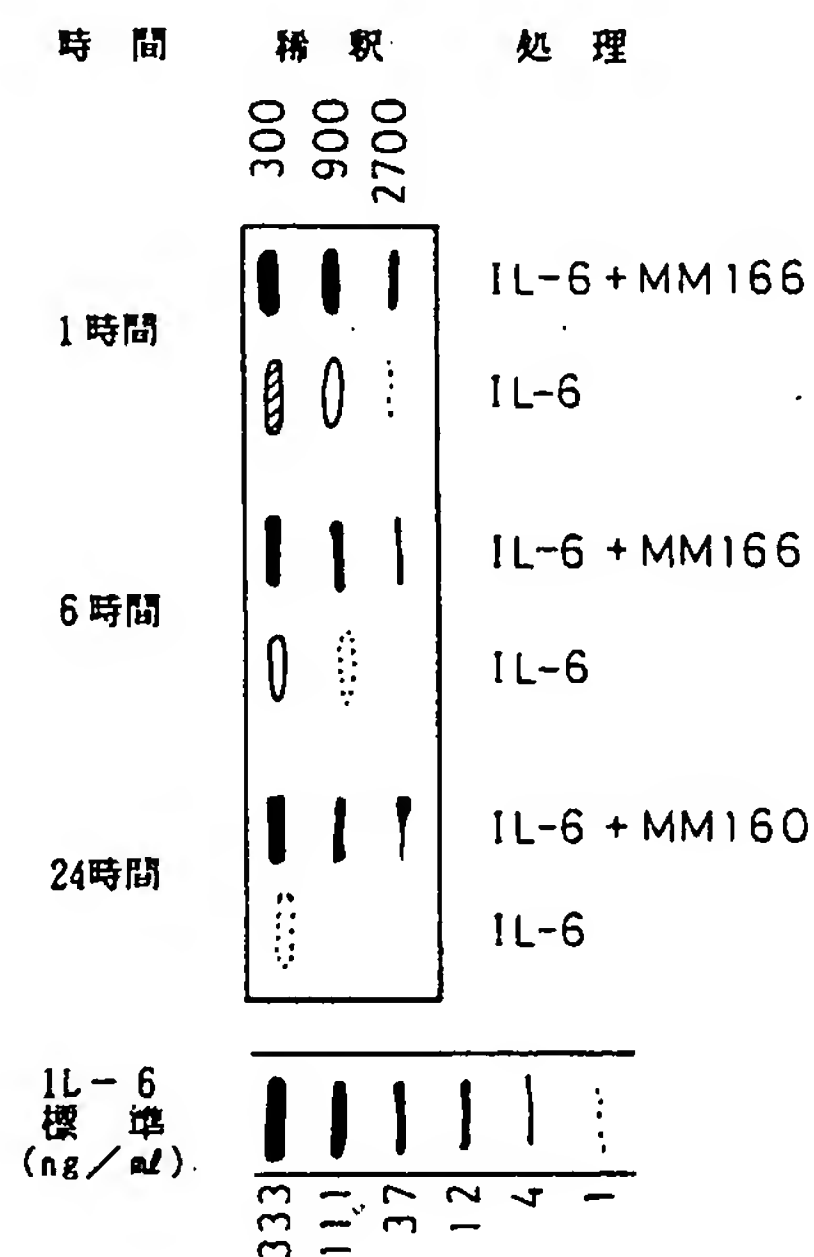
ティング法による測定結果を示した図である。

特許出願人

東ソー株式会社
中外製薬株式会社
岸 本 忠 三

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗
弁理士 石 田 敬
弁理士 福 本 積
弁理士 山 口 昭 之
弁理士 西 山 雅 也



第 1 図